

42
mw

Case 7207

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of :
Shigeki NAMIMATSU : Group Art Unit: 1653
Serial No.: 10/092,462 :
Filed: March 8, 2002 :
For: ANTIGEN ACTIVATING METHOD :
AND ANTIGEN ACTIVATOR :

RECEIVED
TECH CENTER 1600/2900
MAY - 6 5PM 4:46

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

RECEIVED

MAY 08 2002

Honorable Commissioner of Patents
and Trademarks
Washington, D.C. 20231

TECH CENTER 1600/2900

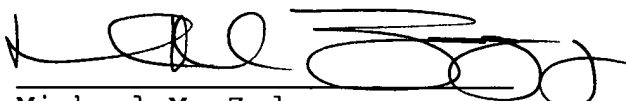
Dear Sir:

Submitted herewith is a certified copy of Applicant's Japanese Patent Application No. 2001-160424, filed May 29, 2001. The right of priority has been claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119.

It is respectfully requested that receipt of this priority document be acknowledged.

Respectfully submitted,

Date: MAY 6, 2002


Michael M. Zadrozny
Attorney for Applicant
Reg. No. 30,985

SHLESINGER, ARKWRIGHT & GARVEY LLP
3000 South Eads Street
Arlington, Virginia 22202
(703) 684-5600
lm

JAPAN PATENT OFFICE

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application
as filed with this Office.

Date of Application: May 29, 2001

Application Number: Patent Application No. 2001-160424
[ST.10/C]: [JP2001-160424]

Applicant (s): Shigeki NAMIMATSU

RECEIVED
TECH CENTER 1500/2599
02 MAY - 6 PM 4:46

RECEIVED
MAY 08 2002
TECH CENTER 1600/2300

March 12, 2002

Commissioner,
Japan Patent Office Kouzo OIKAWA Seal

Certification No. 2002-3016145

Patent Application No. 2001-160424

RECEIVED
TECH CENTER 1600/2300
02 MAY -6 PM 4:46

NAME OF DOCUMENT Application for Patent
REFERENCE NUMBER 212299
FILING DATE May 29, 2001
ATTENTION The Commissioner of the Patent Office
INT'L CLASSIFICATION C12N 09/00

INVENTOR

Address Arusu Kawagoe Room 106, 3-9-4, Arajuku-machi,
 kawagoe-shi, Saitama-ken, JAPAN

Name Shigeki NAMIMATSU

APPLICANT FOR PATENT

Address Arusu Kawagoe Room 106, 3-9-4, Arajuku-machi,
 kawagoe-shi, Saitama-ken, JAPAN

Name Shigeki NAMIMATSU

AGENT

Identification Number 100095267

Patent Attorney

Name Takiro KOJIMA

AGENT

Identification Number 100111604

Patent Attorney

Name Takuya SATO

OFFICIAL FEE

Number of Ledger 056672

Official Fee ¥21,000

Submitted Documents

Name of Document Specification 1

Name of Document Abstract 1

Necessity of Proof Yes

RECEIVED
MAY 08 2002
TECH CENTER 1600/2300

Certification No. 2002-3016145

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 5月29日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-160424

[ST.10/C]:

[JP2001-160424]

出 願 人
Applicant(s):

並松 茂樹

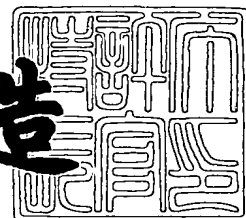
RECEIVED
MAY 08 2002
TECH CENTER 1600/2900

RECEIVED
MAY 08 2002
TECH CENTER 1600/2900

2002年 3月12日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2002-3016145

【書類名】 特許願

【整理番号】 212299

【提出日】 平成13年 5月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 09/00

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市新宿町3丁目9番地4 アルス川越106
号室

【氏名】 並松 茂樹

【特許出願人】

【住所又は居所】 埼玉県川越市新宿町3丁目9番地4 アルス川越106
号室

【氏名又は名称】 並松 茂樹

【代理人】

【識別番号】 100095267

【弁理士】

【氏名又は名称】 小島 高城郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100111604

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐藤 卓也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056672

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗原賦活化法及びその抗原賦活剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 C C A を用いて免疫組織細胞の化学染色における抗原賦活化を行うことを特徴とする抗原賦活化法。

【請求項 2】 前記 C C A を 0 . 0 0 0 1 % ~ 1 0 0 %、p H 1 . 0 ~ p H 1 2 . 0 の C C A 水溶液として用いることを特徴とする請求項 1 に記載の抗原賦活化法。

【請求項 3】 電気ポット、電子レンジ、恒温槽、煮沸及びオートクレーブの中から選択されるいずれかを用いて前記抗原賦活化を行うことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の抗原賦活化法。

【請求項 4】 p H 調節用の 2 0 % ~ 4 % 水酸化ナトリウム水溶液をさらに加えて行うことを特徴とする請求項 3 に記載の抗原賦活化法。

【請求項 5】 免疫組織細胞の化学染色において抗原賦活化に用いる抗原賦活剤において C C A を含むことを特徴とする抗原賦活剤。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫細胞及び組織の化学染色における抗原賦活化方法及び抗原賦活剤に関する。特に、本発明は、スライドガラスに貼付された組織及び細胞を免疫組織化学的に染色する際に、抗原性を露出（賦活化、アンマスキング、Retrieval）するために改良された方法、及びそのための試薬に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来技術】

現在、免疫染色のため用いられる加熱・加圧処理を併用する抗原賦活化に用いられる抗原賦活剤は、主にクエン酸塩緩衝液、トリス塩緩衝液加尿素溶液、E D T A の 3 つがある。

また、抗原賦活化方法としては次のようなものがある。

(1) p H 6 . 0、濃度 0 . 0 1 m o l、クエン酸緩衝液を使って電子レンジ、

オートクレーブ、電気ポット、恒温槽、煮沸による加圧または加熱若しくは加温して賦活化する方法。

(2) pH 7.0、濃度 0.01 mol、クエン酸緩衝液をオートクレーブを使って加圧加熱して賦活化する方法。

(3) pH 9.5、濃度 0.1 mol、Tris-HCl 緩衝液に 5% の尿素を溶かした溶液を使って電子レンジ、オートクレーブ、電気ポット、恒温槽、煮沸で加圧または加熱若しくは加温して賦活化する方法。

(4) pH 8.0、濃度 0.01 mol、EDTA 溶液を電子レンジ、オートクレーブ、電気ポット、恒温槽、煮沸で加圧または加熱若しくは加温して賦活化する方法。

これらが現在用いられている主な技術である。

【0003】

以下、参考文献を引用する。

- 1) Shi S.R., Key, M.E., "Kalra, K.L.: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave ovenheating of tissue sections. J Histochem Cytochem 39: 741-748, 1991
- 2) Shi SR. Cote RJ. Young L. Imam SA. Taylor CR.: Use of pH9.5 Tris-HCl buffer containing 5% urea for antigen retrieval immunohistochemistry. Biotechnic & Histochemistry. 71(4): 190-6, 1996 Jul.
- 3) Cattoretti, G., Becker, M.H.G., Key G., et al.: Monoclonal antibodies produced against recombinant parts of the Ki-67 molecule (MIB-1 to -3) stain proliferating cells in formalin fixed, paraffin-embedded, microwave processed tissues. Histochem J 24:611, 1992 (Abstr)
- 4) Shin, R W., Iwaki, T., Kitamono, T., et al.: Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues. Lab Invest 64:693-702, 1991
- 5) 濱川真治: 抗CD4モノクローナル抗体を用いる酵素抗体法染色の加熱処理抗原賦活化の検討 (病理と臨床 1999, 17(11):1201-1205)

6) 濱川真治：EDTA液に代わる抗原賦活化液の検討（病理技術 1999.60:10-14)

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

現状では、対象とする抗原によってこれらの賦活剤を使い分けているが、作業が繁雑である上、抗原の賦活化も不完全であり、また再現性が非常に乏しい。

本発明の目的は、免疫組織化学染色法の抗原賦活化（アンマスキング）を再現よくかつ簡便に行うための方法及び試薬を提供することである。

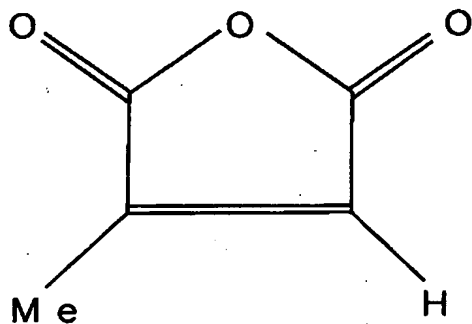
【0005】

【課題を解決するための手段】

上記の目的を達成すべく本発明は、CCAが免疫細胞及び組織の化学染色における抗原賦活化（アンマスキング）に有効であることを発見し、賦活化に最も有効な濃度の溶液を発明したものである。CCAとは、体系名シトラコン酸無水物（2-メチルマレイン酸無水物）、慣用名メチル無水マレイン酸（Citraconic anhydride）であり、化学式は次の通りである。

【0006】

【化1】



【0007】

本発明は、従来の各賦活剤でのアンマスキングと同等、若しくはそれ以上の効果を全ての対象抗原に対してCCA一剤で行うものである。

【0008】

具体的には、免疫組織細胞化学染色を行う上で、組織上の抗原の抗原性がアル

デヒドでマスキングされた組織細胞を賦活化（アンマスキング）するための方法を提供する。この方法は、次の工程からなる。

組織細胞の切片を貼付したスライドガラスをCCA溶液に浸し、電気ポット、オートクレーブ、電子レンジ、煮沸及び恒温槽の中から選択されるいずれかを用いて加熱を行い（オートクレーブの場合は加圧も含む）、賦活化するために十分な時間の間組み合わせる。

CCA溶液は、0.0001%～100%、pH1.0～pH12.0のCCA水溶液であることが好適である。

CCA溶液に対して、pH調節用の20%～4%NaOH（水酸化ナトリウム）水溶液を加えることが好適である。

【0009】

【発明の実施の形態】

本発明は、一般に免疫組織細胞化学的染色において有用である。免疫組織細胞化学的染色手順を行う前に、アルデヒド固定でマスキングされた組織細胞内の抗原性を賦活化・アンマスキングし、抗原抗体反応が起こりやすくなるように改良された賦活法の工程を提供する。その結果、従来染色されにくかった抗原と抗体がより強く反応するようになる。

【0010】

CCAを溶かす水は、不純物を含まない水でなければならない。またスライド上に残留物を残すおそれがある要素を含むべきではない。したがって、水は蒸留水または、好ましくは脱イオン水であることが望まれる。水は免疫組織細胞化学的染色の応用において不純物を含まない水溶液として有用であるが、CCAの濃度は約0.0001～100%、好ましくは0.001%～10%、より好ましくは0.01%～1%、最も好ましくは0.05%である。

【0011】

水素イオン濃度は、酸性から中性ないしはアルカリ性のpH、例えばpH1.0～pH12、好ましくはpH約5.0～pH10.0、より好ましくはpH約7.0～8.0を有する。最も好ましくはpH7.4である。組織細胞のダメージを防ぐためpHは酸性、アルカリ性より生体に近い7.4が好ましい。pH

を調節する塩は20%～4%水酸化ナトリウム水溶液が最も好ましい。溶液の濃度範囲はここに論ずる範囲から変化しない。免疫組織細胞化学的染色に対する予備処理として賦活化を行う。これはパラフィンに埋め込んだ、アルデヒド固定した組織細胞の切片に適用する。抗原を認識させるような、組織細胞の処理の操作を、抗原のアンマスキングまたはアンマスキングと呼ぶ。これを必要とする抗原は、実験的に決定され、そして文献に報告されている。CCA溶液は、一次抗体の適用の前に、そして好ましくは、内因性ペルオキシダーゼ処理の直後に適用する。

【0012】

切片を以下のごとく処理する。

処理に用いる反応時間の範囲は、細胞組織及び抗原が破壊されない限り、アルデヒドによる架橋を崩壊させるために十分なものとする。必要な時間は、温度、CCA濃度、組織の厚さ及びアルデヒド中での時間の長さに依存する。適当な時間は容易に決定することができる。

【0013】

電気ポット（市販のもの）を用いる場合、80℃～100℃において60分～45分の加熱、好ましくは100℃において45分の加熱が、本発明の好適方法において有効である。

【0014】

オートクレーブを用いる場合、121℃において15分～20分び加圧及び加熱、好ましくは121℃において20分の加圧及び加熱が、本発明の好適方法において有効である。

【0015】

電子レンジを用いる場合、98℃～100℃において15分～20分の加熱、好ましくは100℃において20分の加熱が、本発明の好適方法において有効である。

【0016】

ガスレンジ煮沸を用いる場合、95℃～100℃において30分～45分の加熱、好ましくは100℃において45分の加熱が、本発明の好適方法において有

効である。

【 0 0 1 7 】

恒温槽を用いる場合、60℃～70℃において一夜（16時間）の加熱、好ましくは60℃において一夜の加熱が、本発明の好適方法において有効である。

【 0 0 1 8 】

本発明の方法によれば、CCAが、アルデヒド（例えばホルマリン）固定の工程の間になされた損傷から、組織、細胞を救うことが発見された。アルデヒドの固定は、組織細胞の抗原をマスキングする架橋結合を生じ、これにより抗原が抗体を認識することを阻害する。その結果、抗原-抗体免疫染色が起こるのを妨げる。これは間違った陰性の判断を生ずることがあり、その結果、組織細胞の試料の評価に誤りを導くことがある。CCAは、アルデヒドの架橋結合を乱させ組織細胞のアミノ酸に修飾的役割を果たす。その結果、組織の抗原反応基のアミノ酸を抗体と反応するように標識する試薬に暴露する。非特異的染色は結果に誤解を引き起こし、これは結果的に診断を誤診に導くことがある。

【 0 0 1 9 】

【実施例】

- 1) 組織片の切り出し、固定ヒト及び各種動物から得られた臓器を、例えばリンパ節を最大断面にて厚さ1～2cmの組織塊に切り出す。
- 2) 切り出された組織塊を公知の如く、アルデヒド固定液、例えば20%ホルマリン溶液／緩衝液中で固定する。
- 3) 公知の如く、固定された組織塊をアルコールにて脱水する。
- 4) 公知の如く、脱水された組織塊をキシレンにて透徹する。
- 5) 公知の如く、透徹された組織塊を熱で溶解したパラフィン液中に浸漬し包埋する。
- 6) 公知の如く、パラフィン包埋した組織塊を冷却し固体にする。
- 7) 公知の如く、ミクロトームで2～5ミクロンに薄切りにして剥離防止剤のついた、例えばシランをコーティングしたスライドに貼付する。
- 8) 公知の如く、薄切りしたパラフィンのついた切片をキシレンで脱パラフィンし組織を露出させ、アルコールを通して水洗いする。

9) 標本を付けたスライドガラスを、0.05% pH 7.4 の CCA 溶液に浸けよく親和させる。例えば、CD 4 抗原の場合は、電気ポットに CCA 溶液を満たし、切片を貼付したスライドガラスをかごと入れ、強力沸騰を選んで45分間通電し行う。電気ポットは市販のものを利用できる。加熱賦活化を必要とする他の抗原も同様に行うことができる。

また、切片が剥がれやすい場合や、高い温度処理に弱い組織の場合は、恒温槽において60℃で一夜（16時間）加熱処理する。

10) 処理の終わった後、組織切片の貼付したスライドガラスを取り出し、緩衝液中に浸す。

11) 公知の如く、酵素抗体染色法を行う。

【0020】

【発明の効果】

従来の賦活剤に比べて本発明による賦活剤は、強力に賦活化すると共にアンマスキングされた抗原を安定化する結果、抗原抗体反応が鋭敏になり、使用する抗体の濃度を薄くすることができ、抗体の使用量を減らすことができる。試薬の使用量の削減化に加えて、賦活化抗原の安定化による高再現性により、失敗の回数が減ることでコストの削減になる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 免疫組織化学染色法の抗原賦活化（アンマスキング）を再現よく簡便に行うための試薬を提供する。

【解決手段】 スライドガラス上の組織細胞の切片をCCAの適切な溶液濃度、適切な水素イオン濃度に設定された抗原賦活剤を用いて、十分な時間加温加圧又は加熱処理をすることでアルデヒド固定でマスキングされた抗原の抗原性を賦活化させる。この方法は、組織細胞の切片をCCA溶液に浸し、電気ポット、オートクレーブ、電子レンジ、煮沸又は恒温槽で加圧及び／又は加熱を行い賦活化するために十分な時間の間組み合わせる。

【書類名】 手続補正書
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2001-160424
【補正をする者】
【識別番号】 501213734
【氏名又は名称】 並松 茂樹
【代理人】
【識別番号】 100095267
【弁理士】
【氏名又は名称】 小島 高城郎
【手続補正 1】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 発明の名称
【補正方法】 変更
【補正の内容】 1
【手続補正 2】
【補正対象書類名】 明細書
【補正対象項目名】 特許請求の範囲
【補正方法】 変更
【補正の内容】 2
【プルーフの要否】 要

【発明の名称】 抗原賦活化法及びその抗原賦活剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 C C A を用いて免疫組織細胞の化学染色における抗原賦活化を行うことを特徴とする抗原賦活化法。

【請求項 2】 前記 C C A を 0 . 0 0 0 1 % ~ 1 0 0 %、 p H 1 . 0 ~ p H 1 2 . 0 の C C A 水溶液として用いることを特徴とする請求項 1 に記載の抗原賦活化法。

【請求項 3】 電気ポット、電子レンジ、恒温槽、煮沸及びオートクレーブの中から選択されるいずれかを用いて前記抗原賦活化を行うことを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の抗原賦活化法。

【請求項 4】 p H 調節用の 2 0 % ~ 4 % 水酸化ナトリウム水溶液をさらに加えて行うことを特徴とする請求項 3 に記載の抗原賦活化法。

【請求項 5】 免疫組織細胞の化学染色において抗原賦活化に用いる抗原賦活剤において C C A を含むことを特徴とする抗原賦活剤。

特 2001-160424

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2001-160424
受付番号	50100858415
書類名	手続補正書
担当官	藤居 建次 1409
作成日	平成13年 6月21日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成13年 6月14日

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [501213734]

1. 変更年月日 2001年 5月29日

[変更理由] 新規登録

住 所 埼玉県川越市新宿町3丁目9番地4 アルス川越106号室

氏 名 並松 茂樹